Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 15, No. 5, Dec- Jan 2020, p. 577-582

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 15، شماره 5، آذر - دی 1398، ص. 582-577

بررسی اهمیت حلال در تخلیص آبی اجسام روغنی از دانه کلزا

فاطمه سعادت[1]- سید هادی رضوی[2]*- هوشنگ علیزاده[3]

تاریخ دریافت: 1397/08/25
تاریخ پذیرش: 1398/02/12

چکیده

گیاهان روغنی انرژی را به شکل لیپیدهای خنثی در اندامک‌هایی به نام اجسام روغنی (Oil Body) ذخیره می‌کنند. این اندامک‌ها تری اسیل گلیسرول را تا زمان جوانه‌زنی در شرایط و تنش‌های مختلف محیطی حفظ می‌کنند. در سال‌های اخیر اجسام روغنی به‌عنوان امولسیون روغن در آب در صنایع دارویی، غذایی و آرایشی بهداشتی مورد توجه قرار گرفته‌اند. همچنین این اندامک‌ها ابزاری کارآمد در تخلیص، تثبیت و دارورسانی محصولات بیوتکنولوژی محسوب می‌شوند. متداول‌ترین روش جداسازی اجسام روغنی از گیاهان استفاده از محیط‌های آبی است که علیرغم تمام مزایایی که نسبت به استفاده از حلال‌های آلی دارند، از بازده پایین‌تری برخوردار هستند. این مقاله به بررسی کارایی دو حلال بافر فسفات (0/1 مولار، pH =7/5) و آب مقطر در استخراج آبی اجسام روغنی دانه‌های کلزا می‌پردازد. برای این منظور بذور گیاه کلزا (*Brassica napus*. L) از موسسه اصلاح بذر و نهال ایران تهیه گردیدند. سپس پودر کلزا در حلال‌ها به نسبت 1 به 10 (وزنی/ حجمی) به مدت 12 ساعت در دمای اتاق مخلوط شدند. این مرحله 3 بار تکرار گردید. عصاره به‌دست آمده در دور 10 هزار g به مدت 15 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید. لایه شناور با دقت برداشته شده و در بافر اولیه حل گردید و pH آن به 8/5 رسانده شد تا پروتئین‌های تخریب شده حذف گردند. در نهایت، لایه کرمی مجدداً بازیابی شده و در یک دهم حجم اولیه از بافر اوره 9 مولار (pH=7.5) برای 10 دقیقه ترکیب شد تا پروتئین‌های غیراختصاصی از اجسام روغنی جدا گردند. اجسام روغنی تخلیص شده در زیر میکروسکوپ نوری بررسی گردیدند. براساس نتایج میکروسکوپی و ماکروسکوپی، کارایی بافر فسفات بدلیل قابلیت حفظ pH قلیایی در طی استخراج بهتر از آب مقطر بوده و ذرات روغنی استخراج شده با این بافر از پایداری بیشتری برخوردار هستند. از طرف دیگر، بافر فسفات بدلیل ایجاد فشار اسمزی و افزایش حلالیت پروتئین‌های غشایی کارایی تخلیص را تا دو برابر افزایش می‌دهد. این نتایج بیش از پیش اهمیت حضور پروتئین های غشایی در تشکیل و تثبیت اجسام روغنی را مشخص می سازد.

واژه‌های کلیدی: پایداری، امولسیفایر، پروتئین‌های غشایی، بهینه‌سازی، بافر فسفات

مقدمه

سلول‌های یوکاریوتی حاوی اندامک‌هایی برای ذخیره لیپیدهای درون سلولی هستند. این اندامک‌ها در گیاهان عالی با نام اجسام روغنی شناخته شده و بیش از نیمی از وزن دانه‌های روغنی را تشکیل می‌دهند (Zweytick *et al.*, 2000). ساختار اجسام روغنی نسبتا ساده و شامل لیپیدهای خنثی (به‌خصوص تری اسیل گلیسرول‌ها)، غشاء تک لایه فسفولیپیدی و پروتئین‌های غشایی است. شناخته شده‌ترین و متداول‌ترین پروتئین‌های سطح اجسام روغنی گیاهان اولئوسین (1990) و کالئوسین (1999) هستند که علیرغم میزان کمی که دارند (1% حجم اجسام روغنی)، نقش مهمی در پایداری اجسام روغنی بازی می‌کنند (Wang *et al.*, 2012). این پروتئین‌ها آبگریز و قلیایی بوده و دارای سه ناحیه مجزا می‌باشند: انتهای کربوکسیل و آمین آمفی‌پاتیک و ناحیه آبگریز میانی. ناحیه میانی به شدت محافظت شده است و با عبور از غشاء تک لایه فسفولیپیدی به درون اجسام روغنی لنگر می‌اندازد. در مقابل نواحی انتهایی متغیر بوده و بر سطح فسفولیپید و در معرض سیتوپلاسم قرار می‌گیرند بطوریکه بار منفی آنها با ایجاد ممانعت فضایی و دافعه الکتروستاتیکی مانع از ادغام لیپیدهای ذخیره‌ای بخصوص در طی خشک شدن بذر می‌شوند و در نتیجه به متحرک بودن اجسام روغنی در طی جوانه زنی کمک می‌کنند (Bhatla *et al.*, 2010).

اجسام روغنی به علت خاصیت سورفاکتانتی به‌عنوان عوامل تعلیق‌کننده اقتصادی، زیست‌سازگار و تجدیدپذیر مورد توجه هستند و در صنایع غذایی، محصولات دارویی، آرایشی بهداشتی و صنعت مورد استفاده قرار می‌گیرند. به‌علاوه، ابزار جدید و موفقی در صنایع مختلف بیوتکنولوژی از جمله دارورسانی، بیوکپسوله کردن مولکول‌های هیدروفوب و تخلیص، تثبیت، و پایداری پروتئین‌های نوترکیب

1- دانشجوی دکترا، گروه مستقل بیوتکنولوژی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران.
2- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران.
3- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران.
(*- نویسنده مسئول: Email: srazavi@ut.ac.ir)
DOI: 10.22067/ifstrj.v15i4.76637

محسوب می‌شوند (Peng *et al.*, 2003; Bhatla *et al.*, 2010; Nikiforidis and Scholten, 2015). بخش روغنی این اندامک‌ها از کالری روزانه ما و پایه صنایع چند میلیارد دلاری محسوب می‌شوند (Murphy, 2001). به‌طوریکه سالانه بیش از 190 میلیون تن روغن گیاهی در بازار جهانی جهت مصارف غذایی (حدود 90%) و کاربردهایی همچون رنگ‌سازی، روغن‌کاری، تولید شوینده‌ها، پلاستیک، سوخت‌های زیستی، شمع، جوهر و ... مصرف می‌شود (Cahoon and Schmid, 2008). نخل روغنی (31%)، سویا (23%) و کلزا (15%) به‌ترتیب مهمترین منابع روغن در جهان می‌باشند. در این بین روغن کلزا اسیدچرب اشباع کمی داشته و غنی از آلفا لینولنیک اسید (امگا-3) است. بطوریکه حدود 10% از کل روغن را امگا-3 تشکیل می‌دهد. لذا این روغن جزء معدود غذاهایی است که به تنهایی می‌تواند در افزایش امگا-3 بدن موثر باشد. بذور کلزا حاوی 45% (w/w) روغن و بسته به واریته 17 تا 25% پروتئین هستند. اگرچه میزان روغن دانه‌های کلزا بیشتر از سویا (24%) و تقریبا همتراز با نخل (55%) است اما استخراج کارآمد روغن کلزا نسبت به سایر دانه‌های روغنی مانند سویا و آفتابگردان سخت‌تر می‌باشد. به‌طور خلاصه جهت استخراج روغن، دانه‌های کلزا پس از پوست‌گیری، پخته و پرس شده و در نهایت با حلال هگزان روغن‌کشی می‌گردند. این روش بسیار متداول و کارآمد است اما برای استخراج روغن از هر تن دانه کلزا حدود 1 لیتر حلال هگزان و 280 کیلووات بر ساعت انرژی مصرف می‌شود. این انرژی که از سوخت فسیلی یا همان گاز به‌دست می‌آید بیشتر (65%) صرف پختن و خشک کردن دانه‌ها و نیز حلال‌زدایی بقایا می‌شود. از طرفی حلال هگزان ترکیبی سمی، آتش‌گیر و فرار بوده که علاوه بر آلودگی هوا، نیاز به هزینه بالایی برای اجرای قوانین ایمنی زیستی و نگهداری دارد (Miquel *et al.*, 2011). همچنین دغدغه باقی ماندن حلال در روغن کلزا اطمینان به امنیت غذایی این روش را کاهش می‌دهد (Chen and Ono, 2010). از طرف دیگر، هگزان تنها می‌تواند لیپیدهای خنثی را استخراج کند و قابلیت استخراج لیپیدهای قطبی مانند فسفولیپیدها، پروتئین‌های غشایی و درنتیجه اجسام روغنی را ندارد (Iwanaga *et al.*, 2007; Nikiforidis *et al.*, 2014). اجسام روغنی به‌علت خاصیت سورفاکتانتی به‌عنوان عوامل تعلیق‌کننده اقتصادی، زیست‌سازگار و تجدیدپذیر مورد توجه هستند و در صنایع غذایی، محصولات دارویی، آرایشی بهداشتی و صنعت مورد استفاده قرار می‌گیرند. به‌علاوه ابزار جدید و موفقی در صنایع مختلف بیوتکنولوژی از جمله دارورسانی، بیوکپسوله کردن مولکول‌های هیدروفوب و تخلیص، تثبیت، و پایداری پروتئین‌های نوترکیب محسوب می‌شوند (Peng *et al.*, 2003; Bhatla *et al.*, 2010; Nikiforidis and Scholten, 2015).

در حال حاضر متداول‌ترین روش برای استخراج ذرات روغنی سالم و کارآمد در صنایع بیوتکنولوژی و تحقیقات گیاهی، فرایند استخراج آبی است که بر روی طیف وسیعی از دانه‌های روغنی همچون کلزا (Jolivet *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2012)، بادام زمینی (Schwager *et al.*, 2015)، ذرت (Nikiforidis *et al.*, 2011)، آفتابگردان (Millichip *et al.*, 1996)، کدو تنبل (Adams *et al.*, 2012) و غیره صورت گرفته است. این روش نه تنها فاقد مشکلات عصاره‌گیری با حلال هگزان است بلکه می‌تواند هزینه و انرژی لازم برای هموژنایز کردن امولسیون را کاهش دهد. بررسی مکانیسم استخراج آبی اجسام روغنی از گیاهان و بهینه‌سازی آن حوزه جدیدی در صنایع غذایی است. لذا لازم است برای افزایش کارایی و کیفیت و امکان استفاده از این محصول عوامل موثر در تخلیص آن بهینه‌سازی شوند. تاکنون مطالعات متعددی جهت بررسی اثر دما، pH وحضور نمک در کارایی این روش صورت گرفته است (Nikiforidis *et al.*, 2014). با این حال براساس اطلاعات موجود، گزارشی جهت انتخاب بافر مناسب وجود ندارد. لذا در این مطالعه کارایی دو حلال متداول در تخلیص ذرات روغنی، یعنی بافر فسفات و آب مقطر مورد بررسی قرار می‌گیرد.

همچنین باتوجه به نوین بودن این مبحث مروری بر شرایط مطلوب استخراج این اندامک‌های روغنی صورت می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

تهیه بذور کلزا

بذور کلزا (*Brassica napus* L.) رقم احمدی از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه و در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند.

استخراج اجسام روغنی

دانه‌های کلزا به‌خوبی شسته و در مجاورت هوا خشک شدند و سپس با استفاده از آسیاب پودر گردیدند. جهت مقایسه کارایی حلال‌ها، از بافر فسفات 10 میلی‌مولار (pH= 7/5) و همچنین آب مقطر به‌صورت جداگانه جهت استخراج استفاده گردید. نسبت 1 به 10 وزنی حجمی از پودر دانه کلزا و حلال به مدت 24 ساعت در دمای اتاق بر روی همزن مغناطیسی ترکیب شد. سپس مخلوط همگن از کاغذ صافی عبور داده شد تا حلال از پودر جدا گردد. مراحل فوق سه بار تکرار گردید تا اجسام روغنی به‌خوبی استخراج شوند. عصاره استخراج شده با دور 10000g به مدت 15 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید. سپس لایه کرم‌مانند رویی با دقت برداشته شده و به ظرف جدیدی منتقل گردید. لایه کرمی مجدداً در حلال اولیه حل شده و pH بر روی 8/5 تنظیم گردیده و سپس برای یک ساعت روی شیکر گذاشته شد تا پروتئین‌های تانخورده رسوب کنند. سپس لایه کرمی با استفاده از سانتریفوژ بازیابی شده و دریک

دهم حجم بافر اولیه در بافر اوره 9 مولار (pH= 7/5) به مدت 10 دقیقه هم زده شد. این مرحله حداقل 3 مرتبه صورت گرفت تا پروتئین‌های غیراختصاصی و نامحلول غیرغشایی از اجسام روغنی جدا شوند و در هر بار لایه کرمی با استفاده از سانتریفوژ بازیابی شده و در 4 درجه سانتی‌گراد ذخیره گردید. میزان پروتئین کل عصاره‌های استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ در 280 نانومتر قرائت گردید.

بررسی میکروسکوپی

پس از استخراج اجسام روغنی و انجام سانتریفوژ، لایه کرمی و حلال هر عصاره با میکروسکوپ نوری بررسی گردید. برای این منظور یک قطره از نمونه را بر روی شیشه لام قرار داده و به‌خوبی ترکیب کرده تا یکنواخت گردد. سپس حضور ذرات روغنی با بزرگنمایی 40 بررسی گردید.

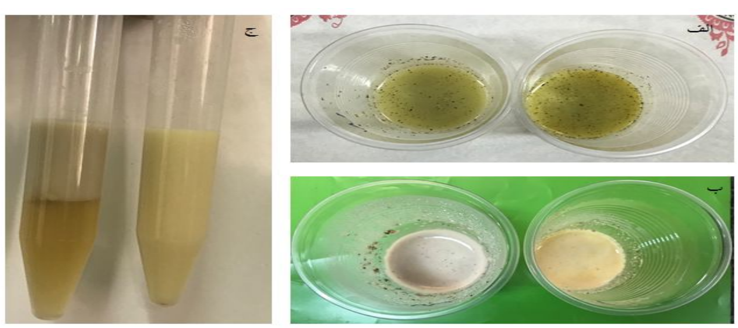
تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

آزمون‌ها با سه تکرار و در قالب طرح کاملا تصادفی مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه 16) انجام گرفت. سطح معنی‌داری در تمام آزمون‌ها 0/05درنظر گرفته شد.

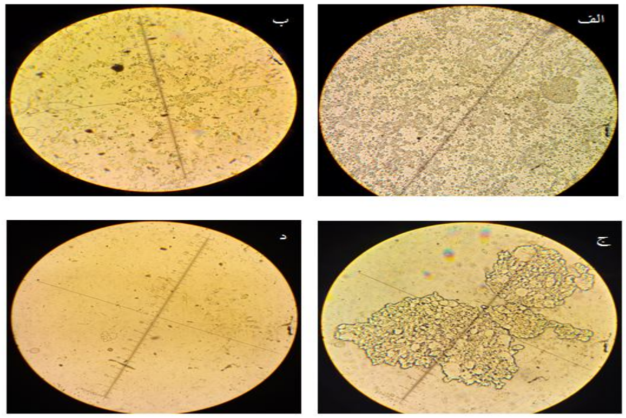
نتایج و بحث

در این مطالعه استخراج ذرات روغنی کلزا با استفاده از دو حلال بافر فسفات و آب مقطر در شرایط کاملاً ثابت آغاز گردید (شکل 1- الف) اما نتایج به‌دست آمده با این دو حلال کاملا متفاوت بود (شکل 1-ب). از آنجاکه این روش مبتنی بر انتشار روغن به حلال است، دانه‌ها پودر شده تا حداکثر تماس بین روغن و حلال برقرار شود. دیواره سلولی گیاهان دارای منافذی به قطر 20 تا 80 نانومتر است که اجازه عبور مولکول‌هایی به جرم 9 کیلودالتون را از پلاسمودسما می‌دهد. براساس مطالعات منتشر شده، هر اندازه نمونه کوچکتر باشد (کمتر از 0/8 میلی‌متر) کارایی تخلیص افزایش می‌یابد. این امر احتمالا به‌دلیل افزایش سطوح در تماس با حلال است. با این حال ذرات بسیار ریز نیز ممکن است سبب به‌هم آمیختگی اجسام روغنی بشوند (Nikiforidis *et al.*, 2011).

سپس پودر حاصله به همراه هریک از بافرها به مدت 12 ساعت بر روی همزن به‌خوبی ترکیب شدند. همزدن نه تنها موانع سلولی را بر می‌دارد، بلکه سبب برهم خوردن تجمعات روغنی، کاهش اندازه ذرات و افزایش تحرک آنها در طی استخراج و در نتیجه انتشار بهتر به‌درون حلال می‌شود. البته برخی محققان معتقدند که افزایش هم زدن تنها در مراحل اولیه سبب افزایش کارایی می‌شود و پس از مدتی اثر معکوس دارد (Nikiforidis *et al*., 2011). لازم به ذکر است که خیساندن نمونه قبل از آغاز استخراج نیز می‌تواند سبب نفوذ آب به درون شبکه سلولی و تسهیل استخراج شود. همچنین افزایش نسبت پودر به حلال، تعداد دفعات شستشو و مدت زمان استخراج می‌تواند بازده عصاره‌گیری را بهبود دهد (Nikiforidis *et al.*, 2014). به‌علاوه، گزارش شده است که استفاده از سیستم آبی همراه با آنزیم می‌تواند کارایی استخراج اجسام روغنی را به حدود 84/5% برساند (Chen & Ono, 2010). همانگونه که در شکل 1-ج مشخص است ذرات روغنی استخراج شده با استفاده از بافر فسفات پایدارتر بوده و حالت تعلیق خود را درون حلال حفظ کرده‌اند. در حالیکه ذرات روغنی استخراج شده توسط آب مقطر با هم ادغام شده و در سطح فوقانی حلال تجمع یافته‌اند. این مطلب توسط میکروسکوپ نوری نیز تأیید گردید. به‌طوریکه علیرغم نزدیکی و تراکم بالای ذرات روغنی در بافر فسفات، استقلال و فاصله ذرات از هم حفظ شده است (شکل 2- الف) اما ذرات روغنی استخراج شده با آب مقطر در هم ادغام شده و قطرات بزرگی از چربی را ساخته‌اند (شکل 2- ج).



شکل 1- استخراج ذرات روغنی کلزا با استفاده از روش آبی. الف) شرایط یکسان عصاره‌گیری با بافر فسفات (راست) و آب مقطر (چپ). ب) تفاوت رنگ عصاره استخراج شده توسط بافر فسفات (راست) و آب مقطر (چپ). ج) تفاوت پایداری ذرات روغنی استخراج شده توسط بافر فسفات (راست) و آب مقطر (چپ).



شکل 2- تصویر میکروسکوپی دو بخش روغنی و حلال عصاره‌ها بعد از اعمال سانتریفوژ. الف) بخش روغنی و ب) آبی عصاره استخراج شده با بافر فسفات. ج) بخش روغنی و د) آبی استخراج شده با آب مقطر.

تجمع اجسام روغنی می‌تواند نشان‌دهنده عدم حضور و یا عدم کارایی پروتئین‌های غشایی باشد. چراکه دافعه الکتروستاتیک و ممانعت فضایی حاصل از پروتئین‌های غشایی عامل اصلی پایداری ذرات روغنی است. یکی از مهمترین عوامل در پایداری پروتئین‌ها pH است. در pH نزدیک به نقطه ایزوالکتریک پروتئین‌های غشایی، بارهای منفی سطح این پروتئین‌ها خنثی شده و در نتیجه اجسام روغنی به‌دلیل تضعیف دافعه الکتروستاتیک تجمع می‌یابند. بدین ترتیب استفاده از pH قلیایی بهتر از pHهای اسیدی و یا خنثی برای تخلیص است و بافر فسفات بدلیل قابلیت حفظ pH و جلوگیری از اسیدی شدن بیش از حد عصاره می‌تواند ذرات روغنی پایداری را استخراج کند (Sukhotu *et al.*, 2014). از طرفی در محیط‌های قلیایی حلالیت پروتئین‌های گیاهی بیشتر است و لذا سبب بهبود استخراج می‌شود. براساس نتایج حاصل از نانودراپ، میزان پروتئین استخراج شده با استفاده از بافر فسفات دو برابر بیشتر از بافر آبی بود ($p<0/01$).

همچنین مقایسه نتایج میکروسکوپی نشان می‌دهد که تراکم ذرات روغنی استخراج شده با استفاده از بافر فسفات بیشتر است و در واقع حجم بیشتری از ذرات روغنی با استفاده از این بافر استخراج شده‌اند. این مطلب براساس شاخص کرمی نیز قابل دریافت بود. چراکه پس از سانتریفوژ عصاره‌ها، حجم لایه کرمی ایجاد شده توسط بافر فسفات دو برابر بیشتر از لایه کرمی آب مقطر بود ($p<0/01$).

با این حال همانگونه که در تصاویر 2- ب و د مشخص است، تفکیک اجسام روغنی از حلال آب مقطر بهتر از بافر فسفات صورت گرفته است چراکه ذرات روغنی کمتری در بخش حلال دیده می‌شود. این امر می‌تواند بدلیل حجم بالای ذرات استخراج شده توسط بافر فسفات و دافعه موجود در بین آنها باشد. بر این اساس می‌توان با استفاده از اولتراسانتریفوژ و نیز ایجاد شیب ساکارز تا غلظت نهایی 20% کارایی تفکیک را افزایش داد (Nikiforidis *et al.*, 2014; Matsumura *et al.*, 2017).

استخراج آبی اجسام روغنی اولین بار توسط Rhee و همکاران در سال 1972 توصیف شد. اگرچه کارایی این روش نسبت به استفاده از حلال‌های آلی کمتر می‌باشد اما محققان در سال‌های اخیر توانسته‌اند با بهینه‌سازی وکنترل شرایط به کارایی حدود 99% دست یابند. به‌طورکلی این روش متاثر از عوامل مختلفی از جمله نسبت حلال به مواد، زمان و دمای استخراج و نیز عوامل موثر در استخراج پروتئین همچون دما، pH و نمک است (Nikiforidis *et al.*, 2014).

براساس نتایج حاصل از این مقاله استخراج اجسام روغنی با استفاده از بافر فسفات کارایی و پایداری بیشتری دارد. با این حال تعدادی از مقالات (Millichip *et al.*, 1996; Jolivet *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2012; Adams *et al.*, 2012) از آب مقطر به‌عنوان حلال استفاده نموده‌اند. همچنین در مقاله‌ای از بافر تریس (500 میلی‌مولار، pH6.8) به‌عنوان حلال استفاده شده است تا میزان پروتئین‌های پس زمینه را کاهش دهند (Su *et al.*, 2018). چراکه مطابق بررسی‌های منتشر شده پروتئین‌های متصل به پروتئین‌های غشایی اگرچه تأثیری در اندازه ذرات روغنی ندارند اما می‌توانند سبب افزایش تجمع ذرات روغنی در اثر افزایش (منفی) پتانسیل زتا و میانکنش‌های آبگریز با دیگر پلی‌پپتیدها شوند (Matsumura *et al.*, 2017).

اگرچه در اغلب موارد، استخراج در دمای بالاتر از 50 درجه، به‌دلیل تجزیه پروتئین‌ها با کاهش بازده همراه است (Nikiforidis *et al.*, 2014)، اما مطالعاتی بر روی دما و pH موثر بر پایداری اجسام روغنی نشان داده است که حرارت بین 30 تا 90 درجه تاثیری بر پایداری اجسام روغنی ندارد اما رابطه مستقیمی بین تغییر pH و پایداری اجسام روغنی وجود دارد. بطوریکه اجسام روغنی در pH 2 و

نیز بزرگتر مساوی 6 پایدار هستند اما در محدوده 3 تا 5 ناپایدارند. درحقیقت در pH نزدیک به نقطه ایزوالکتریک پروتئین‌های غشایی، اجسام روغنی به‌دلیل تضعیف دافعه الکتروستاتیک تجمع می‌یابند. همچنین حضور نمک‌هایی مانند کاتیون‌ها می‌تواند بار منفی موجود بر سطح اجسام روغنی را خنثی کرده و سبب تجمع آنها بشود. البته این تجمع قابل بازگشت است. به‌دلیل اهمیت میانکنش‌های الکتروستاتیک در پایداری، تغییر شبکه بار سطحی می‌تواند پایداری را تحت تأثیر قرار دهد. بنابراین عوامل مختلفی در جهت بهبود این شبکه استفاده شده‌اند به‌عنوان نمونه پکتین، صمغ زانتان، SDS و کاراگینان. حضور سورفاکتانت‌ها نیز نه تنها سبب افزایش دافعه الکتروستاتیک می‌شود بلکه میانکنش‌های آبگریز پروتئین‌های سطح ذرات را بر هم می‌زند (Sukhotu *et al*., 2014).

نتیجه‌گیری

کلید استخراج اجسام روغنی، پروتئین‌های غشایی آن‌ها می‌باشد. در روغن‌کشی با حلال‌های آلی، پروتئین‌ها به همراه کربوهیدرات و فیبرها درون کنجاله باقی می‌مانند و در نتیجه این روش قابلیت تخلیص اجسام روغنی را ندارد. در حالیکه در استخراج آبی، تنها زمانی اجسام روغنی به حلال وارد می‌شوند که ابتدا پروتئین‌های غشایی به حلال انتشار پیدا کرده و مسیر را برای خروج روغن از گیاه فراهم کنند. بنابراین رابطه مستقیمی بین استخراج پروتئین غشایی و اجسام روغنی وجود و باید تمام شرایط استخراج جهت کاهش آسیب به پروتئین‌های غشایی بهینه شود. در مجموع، بافر فسفات قابلیت حفظ pH، اسمولاریتی و غلظت یون‌ها را دارد. از طرفی این بافر ایزوتونیک و غیرسمی است و بخصوص زمانیکه با 0/33 مولار ساکارز ترکیب شود می‌تواند به‌دلیل چگالی بالا کارایی تخلیص و جداسازی ذرات از حلال را افزایش دهد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق توسط پژوهشکده فناوری های همگرای دانشگاه تهران (به شماره D0022) مورد حمایت قرار گرفته است. با تشکر فراوان از خانم‌ها دکتر مهرزاد احمدی، دکتر فریبا ابوئی و دکتر فریبا رفیعی و جناب آقای مهندس مهدی زارعی.

منابع

Adams G. G., Imran S., Wang S., Mohammad A., Kok M. S., Gray D. A., Channell G. A. & Harding S. E., 2012, Extraction, isolation and characterisation of oil bodies from pumpkin seeds for therapeutic use. *Food Chemistry*, 134(4), 1919‑1925.

Bhatla S. C., Kaushik V. & Yadav M. K., 2010, Use of oil bodies and oleosins in recombinant protein production and other biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, 28(3), 293‑300.

Cahoon E. B. & Schmid K. M., 2008, Metabolic engineering of the content and fatty acid composition of vegetable oils. *Advances in Plant Biochemistry and Molecular Biology*, 1(C), 161‑200.

Chen Y. & Ono T., 2010, Simple extraction method of non-allergenic intact soybean oil bodies that are thermally stable in an aqueous medium. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(12), 7402–7407.

Iwanaga D., Gray D. A., Fisk I. D., Decker E. A., Weiss J. & McClements D. J., 2007, Extraction and characterization of oil bodies from soy beans: a natural source of pre-emulsified soybean oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(21), 8711‑8716.

Jolivet P., Tailliart K., Boulard C., Nesi N. & Chardot T., 2006, Purification and protein composition of oil bodies from Brassica napus seeds. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 13(6), 426–430.

Matsumura Y., Sirison J., Ishi T. & Matsumiya K., 2017, Soybean lipophilic proteins — Origin and functional properties as affected by interaction with storage proteins. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 28 120‑128.

Millichip M., Tatham A. S., Jackson F., Griffiths G., Shewry P. R. & Stobart A. K., 1996, Purification and characterization of oil-bodies (*oleosomes*) and oil-body boundary proteins (*oleosins*) from the developing cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Biochemical Journal*, 314(1), 333–337.

Miquel M., Nesi N., Paris N., Larré C., Quinsac A., Savoire R., Lanoisellé J.-L., Jolivet P. & Chardot T., 2011, A continuum of research projects to improve extraction of oil and proteins in oilseed plants. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 18(3), 168‑172.

Murphy D. J., 2001, The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Progress in Lipid Research*, 40(5), 325‑438.

Nikiforidis C., Karkani O. A. & Kiosseoglou V., 2011, Exploitation of maize germ for the preparation of a stable oil-body nanoemulsion using a combined aqueous extraction–ultrafiltration method. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 1122–1127.

Nikiforidis C. V., Matsakidou A. & Kiosseoglou V., 2014, Composition, properties and potential food applications of natural emulsions and cream materials based on oil bodies. *RSC Advances*, 4(48), 25067‑25078.

Nikiforidis C. V. & Scholten E., 2015, High internal phase emulsion gels (HIPE-gels) created through assembly of natural oil bodies. *Food Hydrocolloids*, 43 283-289.

Peng C.-C., Lin I.-P., Lin C.-K. & Tzen J. T. C., 2003, Size and stability of reconstituted sesame oil bodies. *Biotechnology Progress*, 19(5), 1623-1626.

Schwager C., Kull S., Krause S., Schocker F., Petersen A., Becker W.-M. & Jappe U., 2015, Development of a novel strategy to isolate lipophilic allergens (*oleosins*) from peanuts. *PloS one*, 10(4), e0123419.

Shen Z., Wijesundera C. & Ye J.-H., 2012, Effect of seed heat-treatment on the oxidative stability of canola oil body emulsions. *Food and Nutrition Sciences*, 3(07), 981.

Sukhotu R., Shi X., Hu Q., Nishinari K., Fang Y. & Guo S., 2014, Aggregation behaviour and stability of maize germ oil body suspension. *Food Chemistry*, 164 1-6.

Wang G.-Y., Chi Z., Song B., Wang Z.-P. & Chi Z.-M., 2012, High level lipid production by a novel inulinase-producing yeast Pichia guilliermondii Pcla22. *Bioresource Technology*, 124 77-82.

Zweytick D., Athenstaedt K. & Daum G., 2000, Intracellular lipid particles of eukaryotic cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 1469(2), 101-120.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 15, No. 5, Dec- Jan 2020, p. 577-582

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 15، شماره 5، آذر - دی 1398، ص.582-577

The importance of solvent in the aqueous extraction of oil bodies from rapeseed

F. Saadat[1], S. H. Razavi2*, H. Alizadeh[3]

Received: 2018.09.02
Accepted: 2019.04.04

Introduction: Oil plants store energy in the form of neutral lipids in the organelles called oil bodies. These organelles save triacylglycerol until seed germination. In recent years, the oil bodies have been considered as an oil/water emulsion in the pharmaceutical, food, and cosmetic industries. These organelles are also effective tool for purifying, stabilizing and delivery of biotechnology products. Aqueous extraction processing (AEP) is the most common method for oil body extraction. Despite all advantages compared to organic solvent extraction, the yield of AEP still needs to be optimized. Therefore, this study surveys the efficacy of two solvents, phosphate buffer and distilled water in the oil bodies' extraction from rapeseed.

Materials and methods: *Brassica napus* L. seeds were obtained from seed and plant improvement institute, Iran. To compare the efficacy of solvents, 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5) and distilled water were used for extraction. The ground rapeseed was suspended in the buffers in a ratio of 1:10 (w/v) and stirred for 12 hours at room temperature. This step was repeated three times. Then, the extract was centrifuged at 10,000 *g* for 15 minutes at 4 ° C. The floating layer was carefully removed and dissolved again in the initial solvent and the pH was adjusted to 8.5 to precipitate the deflated proteins. Finally, the cream layer was retrieved using centrifuges and one-tenth of the initial buffer volume was applied to the 9 M urea buffer (pH 7.5) for 10 minutes to separate non-specific proteins from oil bodies. The purified oil-bodies were monitored under light microscopy.

Results and discussion: According to the microscopic and macroscopic results, the stability of oil particles and efficiency of extraction would be higher by phosphate buffer due to maintaining a constant alkaline pH during the extraction. Moreover, the presence of different salts in the phosphate buffer increases the purification yield up to twice times as a result of providing osmotic pressure and increasing solubility of membrane proteins. These results emphasize the importance of membrane proteins on the formation and stabilization of oil bodies.

Keywords: Constancy, Emulsifier, Membrane proteins, Optimization, Phosphate buffer

1 Ph.D, Agricultural Biotechnology, University of Tehran
2. Professor, Food Science and Technology, University of Tehran
3. Professor, Agronomy and Plant Breeding, University of Tehran
(*Corresponding Author Email: srazavi@ut.ac.ir)